

Afdeling Diergeneesmiddelen 1984-02-16

RAPPORT 84.24

Pr.nr. 505.0600

Onderwerp: Bepaling van furazolidon in  
eieren.

Bijlagen: 4.

Verzendlijst: directeur, sektorhoofd (3x), direktie VKA, afd. Diergeneesmiddelen (4x), afd. Normalisatie/Harmonisatie, Projektbeheer, Projektleider (Bulzer).



Projekt: Ontwikkeling methoden voor het aantonen en bepalen van  
diergeneesmiddelen op niet microbiologische wijze

Onderwerp: Bepaling van furazolidon in eieren.

Bijlagen: 4

---

Doel:

Het bepalen van furazolidon in eieren op residu niveau met behulp van hogedrukvloeistofchromatografie.


Samenvatting:


Er is een bepalingmethode ontwikkeld voor de bepaling van furazolidon in eieren met behulp van hogedrukvloeistofchromatografie. Met behulp van "diode-array" detectie is ook getracht confirmatie van het gezochte residu uit te voeren.


Conclusie:

De ontwikkelde methode bleek goed te voldoen op een niveau tussen 10 ppb en 1 ppm. De onderste grens van aantoonbaarheid bedroeg 5 ppb. Het terugvindingspercentage over het gehele niveau meer dan 85%.

---

Verantwoordelijk: drs F.G. Buizer 

Medewerker/Samensteller: W.M.J. Beek 

Projektleider: drs F.G. Buizer 

### 1. Inleiding

Furazolidon is een therapeuticum dat in Nederland toegestaan is in standaard gemedicineerde mengvoeders voor varkens en pluimvee. Op voorschrift van een dierenarts mag furazolidon ook gebruikt worden voor andere landbouwhuisdieren.

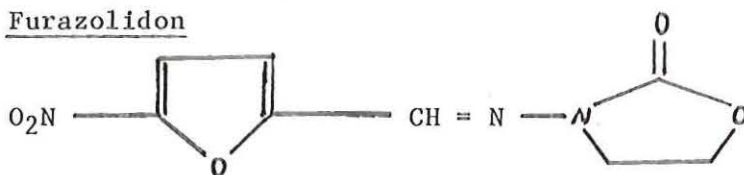
Het wordt gebruikt voor onder andere bacteriële infecties en coccidiën infecties.

Op grond van het feit dat furazolidon kanker blijkt te induceren bij proefdieren en dat het onveranderd of als metaboliet kan worden uitgescheiden is het noodzakelijk analysemethodieken te ontwikkelen voor de bepaling van residuen ervan in de voedselketen.

Toepassing in de pluimveehouderij kan mogelijk aanleiding geven tot residuen in eieren. Tot op heden is er nog weinig bekend over de analyse van furazolidon in eieren. De meeste toegepaste techniek voor de bepaling van furazolidon in voeders is de hogedrukvlloeistofchromatografie. Met deze techniek is nu getracht een methode te ontwikkelen voor de analyse van furazolidon in eieren op residu niveau.

### 2. Structuur en eigenschappen

#### Furazolidon



5-nitro-2-furfurylidene-3-amino-2-oxazolidone.

Molecuulformule:  $C_8H_7N_3O_5$ .

Molecuulmassa : 225,2.

Gele kristallen met een smeltpunt van  $275^{\circ}\text{C}$  (ontleding) oplosbaar in water (pH 6), acetonitril, methanol, butylacetaat en ethylacetaat. De stof is instabiel bij blootstelling aan daglicht en in alkalisch milieu.

### 3. Beschikbare analysemethoden

Voor de bepaling van furazolidon in eieren zijn in de literatuur tot nu toe weinig methoden beschreven.

De meest toegepaste techniek bij de analyse in voeders op ppm niveau is de hogedrukvlloeistofchromatografie. Met deze methodiek zijn ook enkele residubepalingen in vlees beschreven (lit. 1-4). Aan de hand van deze gegevens is getracht een hogedrukvlloeistofchromatografische methode te ontwikkelen voor de analyse van furazolidon in eieren.

#### 4. Ontwikkeling van een methode ter bepaling van furazolidon in eieren

##### 4.1 HPLC

De meest toegepaste techniek is de "reversed phase" HPLC op kolommen met C18 materiaal. De scheiding van furazolidon bleek goed te kunnen geschieden op een CPTM Spher C18 (250 mm lengte x 4,6 mm I.D.) 10  $\mu$  met een eluens: acetaatbuffer pH 5,0 - acetonitril 70-30 bij een isocratische elutie van 1,0 ml/min.

Dit was ook mogelijk op een Hypersil ODS (250 mm lengte x 4,6 mm I.D.) 5  $\mu$  kolom.

De maximale absorptie van furazolidon in het eluens bleek bij 363 nm te liggen wat bepaald werd met een "diode array" detector.

Bij analyse kan men dus kiezen uit een detectiegolflengte van 363 nm bij een variabele golflengtedetector of 365 nm bij een vaste golflengtedetector.

Voor de bepaling van de lineariteit tussen concentratie en detector-signaal werden oplossingen van furazolidon in eluens geïnjecteerd met concentraties van 0,5  $\mu$ g/ml tot 10  $\mu$ g/ml. De regressiecoëfficiënt bedroeg 0,99776 wat betekent dat een redelijke lineariteit gewaarborgd is.

##### 4.2 Extraktie uit eieren

Voor de extraktie van furazolidon uit eieren wordt ethylacetaat toegepast. Dit extraktiemiddel werd ook toegepast bij extraktie uit lever en nieren (lit. 5). Door toevoeging van natriumsulfaat (watervrij) bleek het mogelijk emulsies etc. te voorkomen.

##### 4.3 Zuivering

Voor de zuivering van het extrakt werd gekozen voor vlloeistof-vlloeistofextrakties. Deze werden ook met succes toegepast bij de analyse van chlooramphenicol in eieren (verslag 83.76).

De zuiveringsprocedure staat onderstaand schematisch afgebeeld:



#### Monstervoorbereiding

- ca. 50 g ei-inhoud extraheren met ethylacetaat, natriumsulfaat, fase indampen
- opnemen in acetonitril, zuiveren met isooctaan
- acetonitril indampen tot droog, opnemen in azijnzure oplossing
- waterige azijnzure oplossing drie maal zuiveren met hexaan
- waterige fase drie maal extraheren met dichloormethaan
- verzamelde dichloormethaanfasen indampen tot droog en residu opnemen in HPLC eluens
- eluensfase zuiveren met isooctaan
- eluensfase injecteren HPLC.

#### 5. Bespreking

Met de opgestelde methode werden recovery proeven uitgevoerd op blanco eieren door toevoeging van furazolidon op 10 ppb en 1 ppm niveau. De resultaten staan vermeld in onderstaande tabel.

		Toevoegingsniveau (ppb)	Recovery (%)
Blanco ei	+	10	88
Blanco ei	+	20	96
Blanco ei	+	40	96
Blanco ei	+	50	105
Blanco ei	+	110	90
Blanco ei	+	175	96
Blanco ei	+	290	85
Blanco ei	+	460	104
Blanco ei	+	580	101
Blanco ei	+	1150	85

De gemiddelde recovery bedraagt 95% met een minimum van 85% en een standaarddeviatie van 7,4.

Met een monsteroplossing werden ook analyses uitgevoerd bij vijf verschillende absorptiegolflengtes van de detector bij HPLC.

Van de toegepaste 230, 254, 260, 320 en 365 nm bleek bij 365 nm de grootste gevoeligheid te zijn en de minste storing tengevolge van de matrix (bijlage).

Bij blootstelling van een oplossing furazolidon in HPLC eluens aan daglicht gedurende 1 dag leverde een daling van ca. 50% op zodat werken bij uitsluiting van daglicht beslist noodzakelijk is.

Met diode array detectie is het mogelijk absorptiespectra op te nemen van de bekende furazolidonpiek en van de te verwachten piek zodat onbekende monsters vergeleken kunnen worden met standaarden. Deze confirmatiemethode kan een eventuele identificatie van furazolidon opleveren.

#### 6. Conclusie

De ontwikkelde methode bleek goed te voldoen op een niveau tussen 10 ppb en 1 ppm. De onderste grens van aantoonbaarheid bedroeg 5 ppb. Het terugvindingspercentage over het gehele niveau bedroeg meer dan 85%.

#### 7. Literatuur

7.1 B.A. Hoener, G. Lee en W. Lundergan

High Pressure Liquid Chromatographic Determination of Furazolidon in Turkey Tissue.

J. Assoc. Off. Anal. Chem. (Vol. 62, no. 2, 1979, pp. 257-261).

7.2 W. Winterlin, G. Hall en C. Mourer

Ultra Trace Determination of Furazolidone in Turkey Tissues by Liquid Partitioning and High Performance Liquid Chromatography.

J. Assoc. Off. Anal. Chem. (Vol. 64, no. 5, 1981, pp. 1055-1059).

7.3 M. Petz

Verfahren zur rückstandsanalytischen Bestimmung von Furazolidon und vier weiteren Nitrofuranen in Eiern, Milch und Fleisch durch HPLC.

Deutsche Lebensmittel-Rundschau (78. Jahrg.) Heft 11 (1982) pp. 396-401.

7.4 E.A. Sugden, A.I. MacIntosh en A.B. Vilim

High Pressure Liquid Chromatographic Determination of Nitrofurazone and Furazolidone in Chicken and Pork Tissue.

J. Assoc. Off. Anal. Chem. (Vol. 66, no. 4, 1983, pp. 874-880).

7.5 G.F. Ernst en A. van der Kaaden

High Performance Liquid Chromatographic Analysis of Furazolidone in Liver and Kidney.

J. of Chromatography 13.035.

Bijlagen

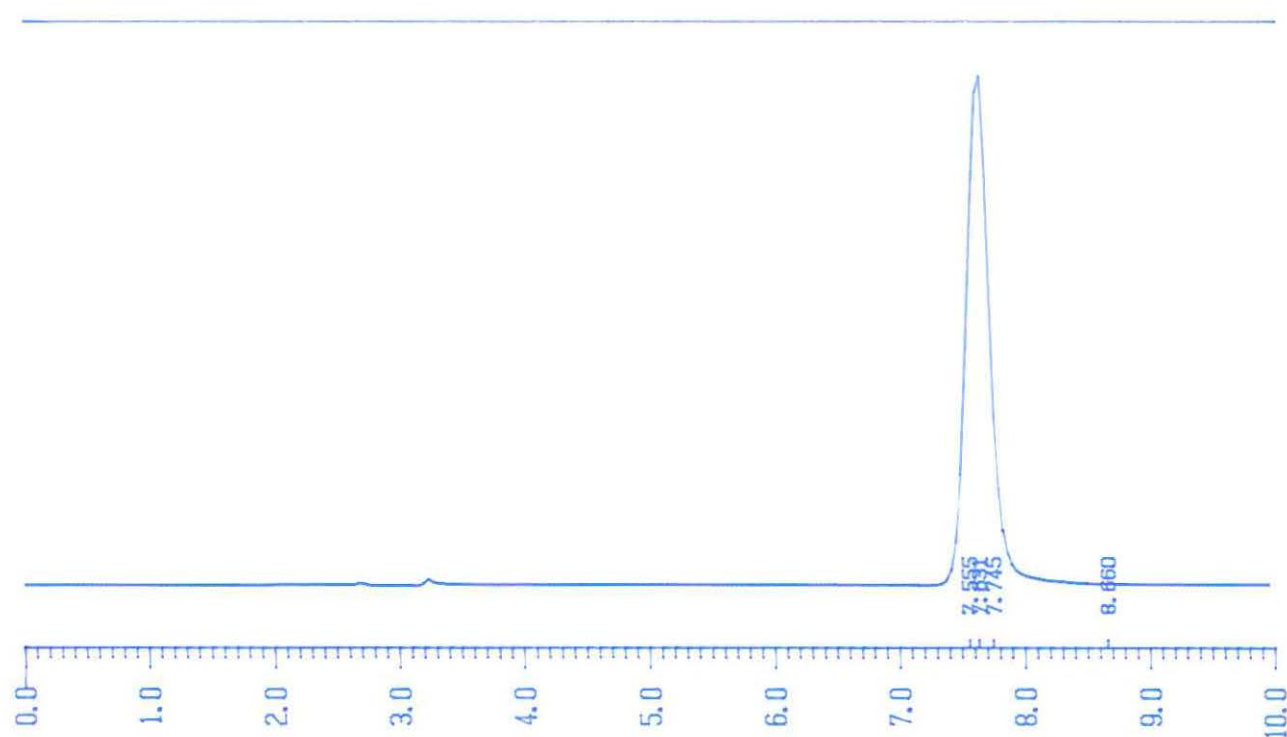
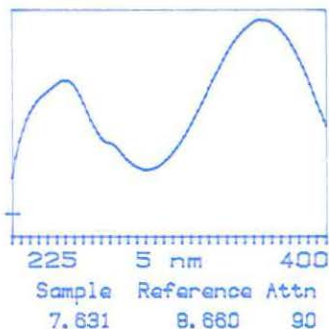
1. Chromatogram + absorptiespectrum.
2. Chromatogrammen van een monsteroplossing bij diverse absorptiegolflengtes met dezelfde referentiegolflengte.
3. Absorptiespectrum.
4. Intern Analysevoorschrift.



File: RAWDAT  
Date: 01/31/1984

RIKILT  
origin

hp 1040A



analysis FURAZOLIDON  
inj. vol. 50  $\mu$ l  
mobile ph. ACETAATBUFFER pH=5.0  
" ACETONITRIL  
" 70/30 1.0 ML/MIN  
stat. ph. CP SPHER C18 10 $\mu$   
column 250\*4.6  
Inj. Time: 15:01  
Attn [mAU]: 100.0 ( 81.3)  
Zero%: 10%  
Signal: D: 6,8 Set M

Wavelength:  
1. 210. 4  
2. 230. 4  
3. 254. 4  
4. 260. 4  
5. 280. 4  
6. 365. 4  
7. 450. 50  
8. 550. 50

Time [min]

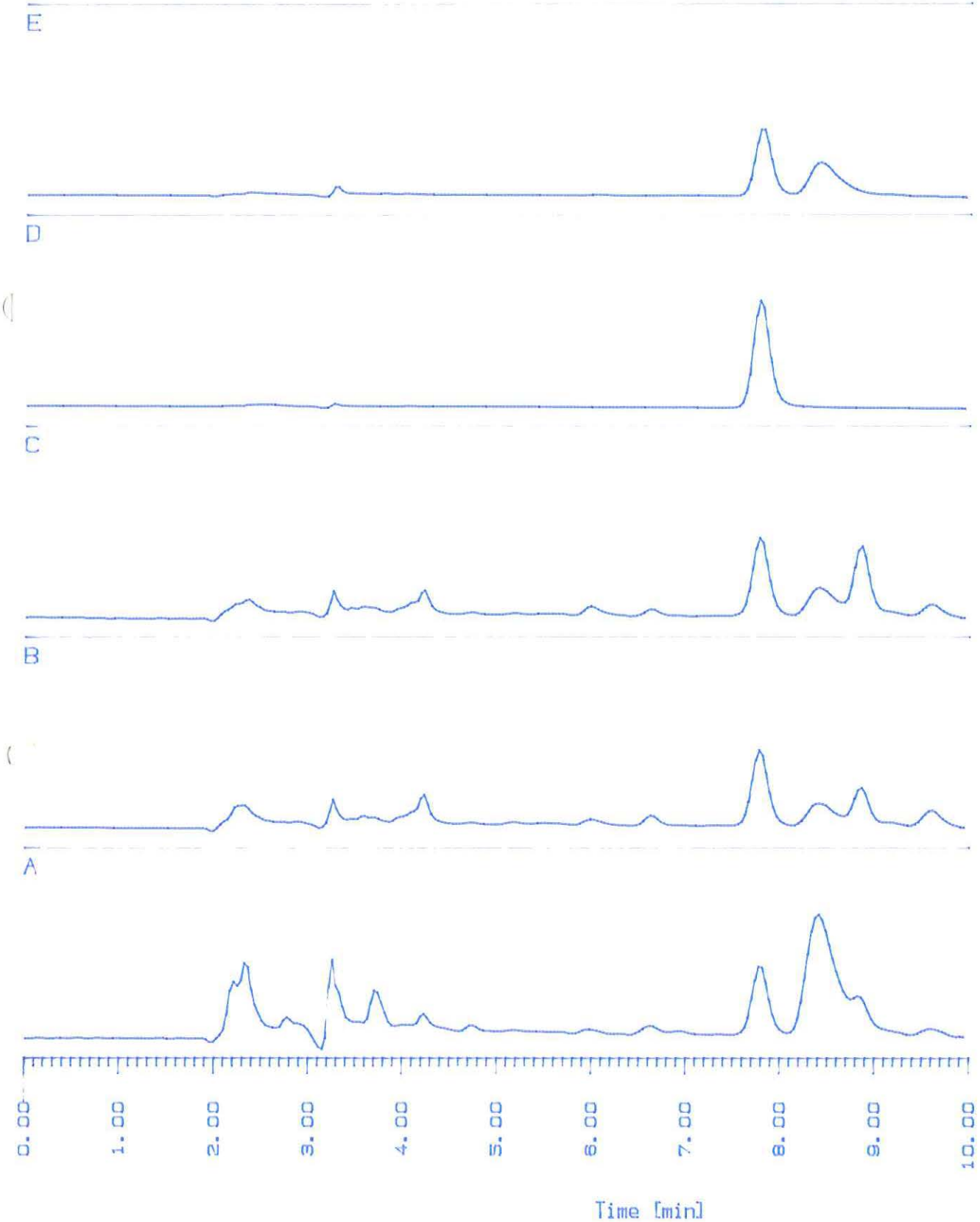
Operator:

File: RAWDAT  
Date: 02/02/1984  
Inj. Time: 13:04

A 2,8:	25.0 (	14.6)	mAU	10%
B 3,8:	25.0 (	9.1)	mAU	10%
C 4,8:	25.0 (	9.2)	mAU	10%
D 6,8:	25.0 (	12.3)	mAU	10%
E 7,8:	25.0 (	7.7)	mAU	10%

hp 1040A

Wavelength	
1.	210, 4
2.	230, 4
3.	254, 4
4.	260, 4
5.	280, 4
6.	365, 4
7.	320, 4
8.	550, 50



INTERN ANALYSEVOORSCHRIFT NR. DGM 35

1e oplage (1984-02-03)

EIEREN ~ BEPALING VAN FURAZOLIDON DOOR MIDDEL VAN HPLC

Verzendlijst: sektorhoofd, afdeling Normalisatie (Humme), afdeling  
Diergeneesmiddelen, Bibliotheek (5x), afd. Toxicologie  
(5x)